

Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.
12. Jg. 1974, S. 54–58

Eine automatische immunologische Methode zum quantitativen Tetanus-Antikörper-Nachweis

Von H. Ebeling

Aus dem Institut für Klinische Chemie und Klinische Biochemie (Direktor: Prof. Dr. H.-J. Dulce) am Klinikum Steglitz der Freien Universität Berlin

(Eingegangen am 13. Juli 1973)

Am Beispiel des Tetanus wird eine neue automatische immunologische Methode demonstriert, mit der schnell, spezifisch und empfindlich quantitative Tetanus-Antikörper-Bestimmungen durchgeführt werden können. Mit dieser Methode ist man in der Lage, nicht nur therapeutische, sondern auch prophylaktische Antikörper-Konzentrationen im Schuttschwellenwert-Bereich nachzuweisen. Diese Methode zeigt gute Übereinstimmung mit den an dieser Methode ermittelten Antikörper-Konzentrationen und den an der „L₊-Methode an der Maus“ ermittelten Antitoxin-Einheiten.

An automatic immunological method for the quantitative determination of Tetanus antibodies

A new, automatic immunological method is presented, and its application for the rapid, specific and sensitive quantitative determination of Tetanus antibodies is shown. With this method it is possible to perform not only therapeutic, but also prophylactic antibody measurements in the defense threshold region. The antibody concentrations from this method show good agreement with antitoxin values obtained by the „L₊-method in the mouse.“

Bisher übliche quantitative Tetanus-Antikörper-Bestimmungsverfahren sind z. T. wenig empfindlich, dabei arbeits-, kosten- und zeitaufwendig. Der Agargel-Diffusionstest (Laborvorschrift Behringwerke AG-Kontroll-Lab. 1967) ist dabei am unempfindlichsten, relativ ungenau und hat eine untere Nachweisbarkeitsgrenze von etwa 2000 bis 3000 I. E./l (siehe auch (1)). Arbeitsaufwendiger, jedoch recht empfindlich ist der indirekte Häm-agglutinationstest mit einer unteren Nachweisbarkeitsgrenze von etwa 30–40 I. E./l (2, 3). Mit einer unteren Nachweisbarkeitsgrenze von 5 I. E./l gilt die „L₊-Methode an der Maus“ als sehr empfindlich und genau (Laborvorschrift Behringwerke AG-Kontroll-Lab. 1972, zit. n. l. c. (1)), (4). Sie hat den Vorteil der in vivo-Testung, wobei die antitoxischen Eigenschaften der Antikörper bestimmt werden. Die Methode ist jedoch arbeits-, kosten- und zeitaufwendig. Neuerdings gibt es eine hochempfindliche radioimmunologische Tetanus-Antikörper-Bestimmungsmethode, deren untere Nachweisbarkeitsgrenze bei 1 I. E./l liegt (5). Die Methode ist jedoch zeitaufwendiger und nicht so preisgünstig.

Anliegen dieser Arbeit ist es, eine spezifische, empfindliche und genaue Methode zur Tetanus-Antikörper-Bestimmung zu entwickeln, die mit wenig Arbeits- und Kostenaufwand rasch zum Ergebnis führt. Dabei ist es das Ziel gewesen, mindestens die Tetanus-Antitoxin-Schutzschwelle im Serum, die mit 10 I. E./l angegeben wird (3, 6, 7), nachzuweisen. Dieser Antikörper-Meßmethode liegt das Prinzip zugrunde, bei konstantem Antigenüberschuß variable Antikörperkonzentrationen zu bestimmen (8). Das hier beschriebene Ver-

fahren bedient sich der hochempfindlichen Nephelometrie. Es werden u. a. optimale Verhältnisse von pH-Wert, Ionenstärke, Antigen- und Antikörper-Konzentrationen ermittelt.

Material und Methoden

Geräte

Technicon Auto Analyzer:
Sampler II
Proportioning Pump I
Manifold
Transformer und Volstat
II Flurnephelometer
Einstellung FN 419
Reference Aperture 1
Sample Aperture 2
Flowcell 013-B008-01
Recorder und Chart No R0483
Pumpenschläuche
Primär- und Sekundärfilter:
Schmalband Nr. 518 7000 (355 nm)
sekundär zusätzlich: Neutralschichtfilter Nr. 518 7040 und
Nr. 518 7041 (0,6 und 0,3)
Probentöpfchen
Meßschablone (für Partigenplatten) (Behringwerke AG)
Tischzentrifuge, 11 000 g (Ecco)
Reaktionsgefäße (Eppendorf)
Plastikspritzen für Filtrationsaufsätze, 10 ml (Jintan Terumo Co. Tokyo)
Filtrationsaufsätze (Sartorius-Membranfilter GmbH)
Membranfilter Porengröße 0,1; 0,05 µm
(Sartorius-Membranfilter GmbH)

Reagenzien

Tetanus-Toxoid 1300 × 10³ L_f/l, Op.-Nr. 24/29 (Behringwerke AG)
Tetanus-Toxoid TTAG 1, 10 × 10³ L_f/l (Behringwerke AG)

Tetanus-Standardserum (human) TSAG 2, 10 000 I. E./l (Behringwerke AG)

Tetanus-Antitoxin-Plasmen T. I. P. (human) 16 000 und 23 000 I. E./l (Behringwerke AG)

Michaelis-Puffer-HCl-Lösung: Mit tridest. Wasser angesetzt, Gesamtsalzkonzentration 10 mmol/l, pH 5,13:
2,967 mmol/l Natriumdiäthylbarbiturat p. a. (Merck)
2,967 mmol/l Natriumacetattri-hydrat p. a. (Merck)
mit etwa 4,066 mmol/l HCl Titrisol (Merck) unter Kontrolle mit der pH-Glaselektrode auf genau pH 5,13 einstellen.

35 mg/l Triton x-100 (Technicon Chemicals S. A.)

Polyäthylenglykol 1500 DAB 7 (Hoechst)

Vorgehen

Im Prinzip werden die Bestimmungen nach dem Fließschema (Abb. 1) durchgeführt. Durch das kontinuierliche Hindurchfließen der Reaktionsgemische durch die Meßküvette soll ein Aggregieren und Sedimentieren sich bildender Immunpräzipitat-Teilchen verhindert werden. Vor Gebrauch wird streng auf visuell partikelfreie Lösungen geachtet. Die unverdünnten Antigen- und Antikörperlösungen werden bei 11 000 g zentrifugiert, das Verdünnungsmittel und die vorverdünnten Antigen- und Antikörper-Lösungen werden durch entstaubte Papierfaltenfilter in staubfreie Gefäße filtriert. Nach den jeweiligen Versuchen wird das Durchlaufsystem gründlich mit filtriertem tridestilliertem Wasser gespült.

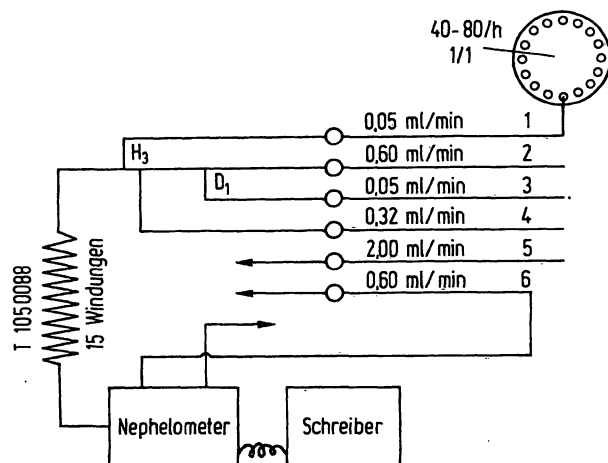


Abb. 1. Fließschema zur Tetanus-Antikörper-Bestimmung: Schlauch Nr. 1 = vorverdünnte Antikörper-Probe; Nr. 2 = Puffer-Lsg.; Nr. 3 = a) zur Eigenstreuungsbestimmung der Antikörper wird Puffer-Lsg. angesaugt, b) zur Antigen-Antikörper-Reaktion wird über diesen Schlauch Antigen-Lsg. angesaugt; Nr. 4 = Luftschlauch; Nr. 5 = Puffer-Lösung als Waschlösung zum Probennehmer; Nr. 6 = Küvettenabsaugung.

Antigen-Antikörper-Reaktion

Mit einem 10- bis 15-minütigen Vorlauf von Tetanus-Toxoid-Lösung über Schlauch Nr. 3 wird die Antigen-Basislinie erhalten. Mit Verstellen des Baseline-Knopfes am Fluoronephelometer wird sie auf eine gewünschte Höhe eingestellt. Verläuft die Basislinie parallel zum linken Schreiberrand, werden über Schlauch Nr. 1 die vorverdünnten Antikörperproben angesaugt. Zuerst wird geeicht. Als Eichlösung dient ein Serum oder Plasma mit bekanntem Tetanus-Antitoxin-Gehalt, aus der eine Verdünnungsreihe hergestellt wird. Beim Ansaugen dieser Eichlösungen empfiehlt es sich, mit der Probe der höchsten Antikörperkonzentration zu beginnen. Durch Verstellen des Standard Calibration-Knopfes am Fluoronephelometer wird für diesen größten Meßpeak eine zweckmäßige Spreizung vorgenommen. Diese Antikörperkonzentration muß auf dem aufsteigenden Schenkel der Antikörperbestimmungskurve, der sog. „Antigenüberschuß-Zone“, liegen (siehe auch Abb. 2 u. 6)

(8). Die als Meßpeaks aufgezeichneten Streulichtintensitäten sind durch das Immunpräzipitat und die Eigenstreuung der Antikörperproben bedingt.

Eigenstreuung

Zur Ermittlung der Eigenstreuung der Antikörperproben wird wie oben vorgegangen, nur wird über Schlauch Nr. 3 statt der Antigen-Lösung Antigenverdünnungsmittel angesaugt. Wichtig ist, daß die Eigenstreuung bei der gleichen Apparat-Verstärkung (= Standard Calibration-Knopf-Einstellung bleibt unverändert) wie oben bestimmt wird.

Auswertung

Die Streulichtintensität des reinen Antigen-Antikörper-Komplexes ergibt sich aus der Peakhöhendifferenz Antigen-Antikörper-Komplex-Peak inklusive Eigenstreuung minus Eigenstreuungspeakhöhe (siehe Abb. 2). Wegen geringer Peakhöhen im Antikörperbereich kleiner als 5 I. E./l empfiehlt es sich, zur Erhöhung der Meßgenauigkeit eine Meßschablone mit 0,1 mm-Einteilung zum Abmessen zu verwenden.

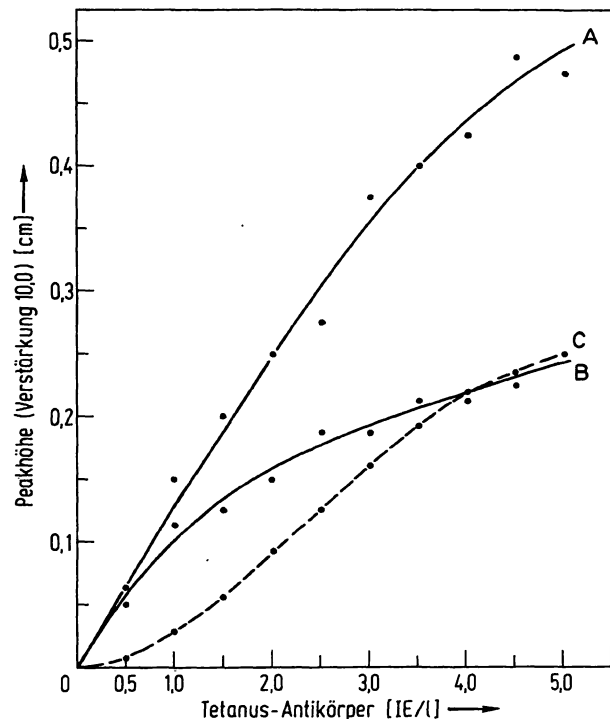


Abb. 2. Auswerten unter Berücksichtigung der Eigenstreuung der Antikörperproben: Tetanus-Antikörper-Eichwerte von 0,5 bis 5,0 I. E./l in 0,5 I. E./l-Schritten. Antigen-Tetanus-Toxoid = 4000 Lf/l. Antigen- wie Antikörper-Lösungen in *Michaelis*-Puffer-HCl-Lösung, Gesamtpuffersalz-Konzentration 16,9 mmol/l, pH 5,13, angesetzt. Abszisse: Antikörperkonzentration in I. E./l. Ordinate: Streulichtintensität in cm-Peakhöhe (Verst. 10,0). Kurve A = Immunpräzipitat plus Eigenstreuung, Kurve B = Antikörper-eigenstreuung, Kurve C = korrigierte reine Antigen-Antikörper-Immunspezifität-Kurve = korrigierte Kurve A minus korrigierte Kurve B.

Ergebnisse und Diskussion

Es wird das von uns beschriebene zugrundeliegende Prinzip der quantitativen Antikörper-Bestimmung angewendet (8). Wie aus Abbildung 3 und 4 ersichtlich, erbringen pH-Wert- und Ionenstärken-Opti-

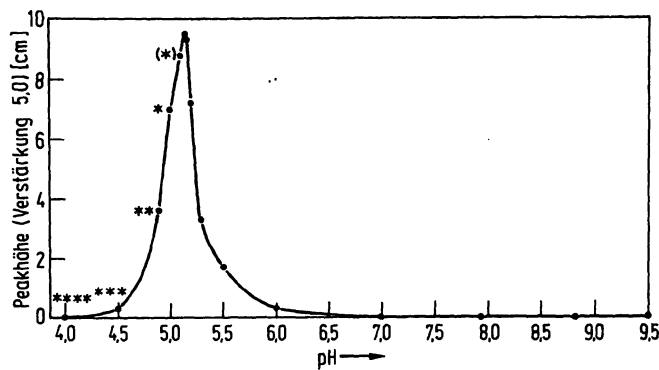


Abb. 3. Abhängigkeit der Meßpeakhöhe vom pH-Wert des Reaktionsgemisches:
Antigen- (100×10^3 Lf/l) und Antikörper- (197,5 I. E./l) Reaktionsgemische in *Michaelis*-Puffer-HCl-Lösung des jeweiligen pH-Wertes bei etwa 41,5 mmol/l Gesamtpuffersalzkonzentration. (*)-**** zunehmendes Trübwerden und Ausfällen der Antigen-Lösung. Abszisse: pH-Wert im Reaktionsgemisch. Ordinate: Peakhöhe in cm (Verst. 5,00).

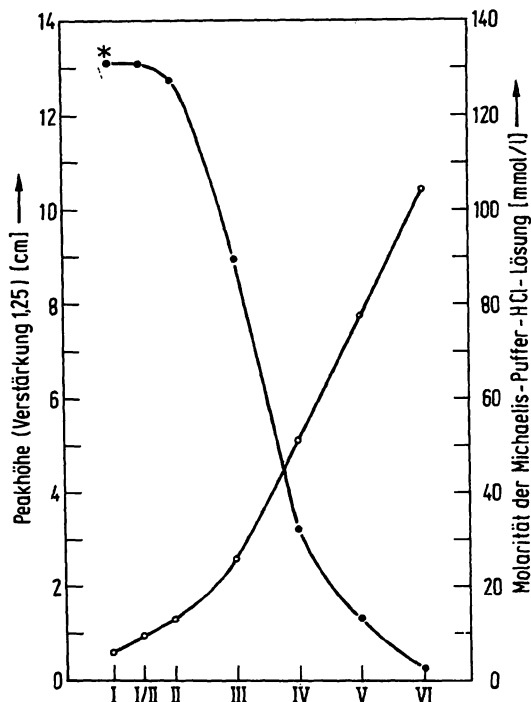


Abb. 4. Abhängigkeit der Meßpeakhöhe von der Ionenstärke:
Abszisse: Ansätze der Antigen- (100×10^3 Lf/l) und Antikörper- (197,5 I. E./l) Reaktionsgemische mit verschiedenen Puffer-Konzentrationen in mmol/l (I = 6,5; I/II = 9,75; II = 13,01; III = 26,02; IV = 52,04; V = 78,06; VI = 104,08). Ordinate, links: Reine Antigen-Antikörper-Präzipitat-Peakhöhen in cm (Verst. 1,25), (●-●); rechts: Molarität der Puffersalzgemeinschaft I-VI in mmol/l *Michaelis*-Puffer-HCl-Lösung, pH 5,13 (○-○).
* Opaleszenz von Antigen- bzw. Antikörper-Lösung.

mierung die entscheidenden Verbesserungen einer sonst allgemein als wenig empfindlich erachteten Immunpräzipitationsmethode zur Tetanus-Antikörper-Bestimmung. Es existiert nur ein schmaler pH-Bereich mit einem Optimum bei pH 5,13, in dem Tetanus-Toxoid-Antikörper-Komplexe in Form von Streulichtintensitäten nachweisbar sind (siehe Abb. 3). Die Abhängigkeit der

Immunpräzipitatbildung von der Gesamtpuffersalz-Konzentration im Reaktionsgemisch verdeutlicht Abbildung 4. Mit einer Gesamtpuffersalz-Konzentration von 10 mmol/l im Reaktionsgemisch verstärkt sich die Streulichtintensität und damit die Empfindlichkeit der Methode erheblich.

Jedoch kann es abhängig von den Konzentrationen an Begleitproteinen in den Antigen- und Antikörper-Lösungen bei pH-Werten kleiner als 5,13 und Salzkonzentrationen kleiner als 10 mmol/l zu leichten bei niedrigerer und zu stärkeren Trübungen bei höherer Begleitprotein-Konzentration kommen. Es empfiehlt sich dann, die getrühten Lösungen vor Gebrauch klar zu zentrifugieren. Die Antigen-Antikörper-Reaktionen dieser klaren Überstände verhalten sich quantitativ völlig unbeeinflusst. Stark verdünnte Antigen- und Antikörper-Lösungen bleiben unter den beschriebenen Milieu-Bedingungen visuell klar. Wie Abbildung 5 und 6 zeigen, besteht auch im Tetanus-Antigen-Antikörper-System eine deutliche Abhängigkeit der Immunpräzipitat-Streulichtintensität a) von der Antigen-Konzentration bei jeweils konstanter Antikörper-Konzentration (siehe Abb. 5) und b) von der Antikörperkonzentration bei jeweils konstanter Antigen-Konzentration (siehe Abb. 6). Abbildung 5 sagt aus, daß diese Methode geeignet ist, Tetanus-Toxoid-Konzentrationen zu bestimmen, wenn das Prinzip zur Antigenbestimmung mit der „Heidelberger-Kurve“ angewendet wird. Nur im Antikörper-Über-

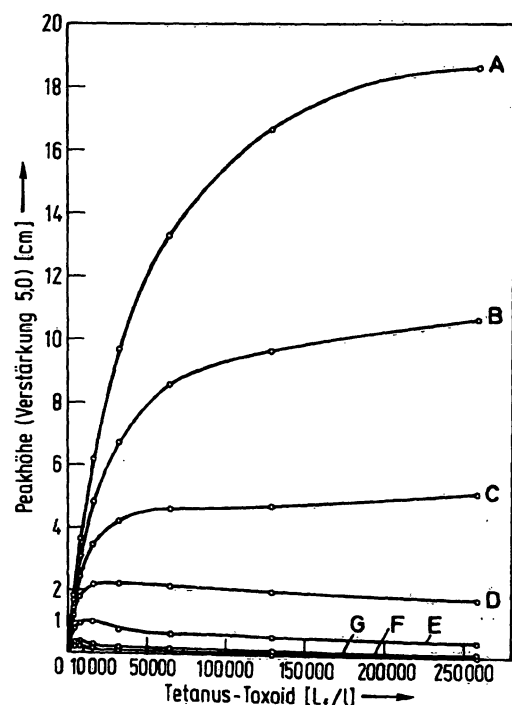


Abb. 5. Abhängigkeit der Antigen-Antikörper-Komplexbildung von der Antigen-Konzentration:
Abszisse: Antigen-Konzentration (Tetanus-Toxoid) in Lf/l. Ordinate: Peakhöhe in cm (bei Verst. 5,0). In den jeweiligen „Heidelberger“-Kurven sind die Antikörper-Konzentrationen konstant: Kurve A = 160 I. E./l, B = 80 I. E./l, C = 40 I. E./l, D = 20 I. E./l, E = 10 I. E./l, F = 5 I. E./l, G = 2,5 I. E./l. Reaktionslösungen in *Michaelis*-Puffer-HCl-Lösung, pH 5,13; 16,9 mmol/l.

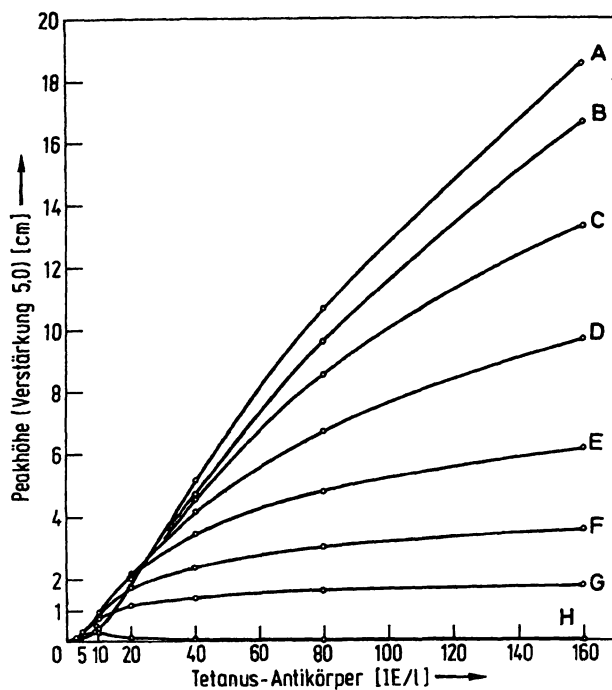


Abb. 6. Abhängigkeit der Antigen-Antikörper-Komplexbildung von der Antikörperkonzentration:

Abzisse: Tetanus-Antikörper-Konzentration in I. E./l. Ordinate: Peakhöhen in cm (Verst. 5,0). Die Tetanus-Toxoid-Konzentrationen sind in den jeweiligen Antikörper-Bestimmungskurven konstant: Kurve A = 260; B = 130; C = 65; D = 32,5; E = 16,25; F = 8,125; G = 4,0625; H = $1,0 \times 10^3$ L_f/l. Antigen- und Antikörper-Lösung in Michaelis-Puffer-HCl-Lösung, pH 5,13; 16,9 mmol/l.

schuß-Bereich (= linker aufsteigender Schenkel der „Heidelberger-Kurve“) können Antigen-Bestimmungen durchgeführt werden. Aus Abbildung 6 geht hervor, daß Tetanus-Antikörper-Bestimmungen quantitativ nur im Antigenüberschuß-Bereich der sog. Antikörperbestimmungskurven (= linker aufsteigender Schenkel) auszuführen sind. Ersichtlich aus Abbildung 5 und 6 beträgt das optimale Verhältnis (= der lineare Teil der aufsteigenden Schenkel der Eichkurven) von Antigen (in L_f) zu Antikörper (in I. E.) zur Antigenbestimmung 20:1, zur Antikörperbestimmung 10000:1.

Abbildung 7 schildert Versuche mit Polyäthylenglykol-Zusatz in Anlehnung an Hellsing (9). Es kann bestätigt werden, daß eine bestimmte Polyäthylenglykol-Konzentration (hier 6%) die Streulichtintensität der Antigen-Antikörperkomplexe erhöht. Da aber gleichfalls die Eigenstreuungen der Lösungen zunehmen und vor allem eine starke Unruhe der Basislinie bei maximaler Geräteverstärkung zu bemerken ist, kann dieser Vorteil zur Empfindlichkeitssteigerung dieser sonst schon optimierten Methode nicht mehr genutzt werden, es sei denn zu Lasten der Präzision der Methode.

Die hier beschriebene automatische Tetanus-Antikörper-Bestimmungsmethode dauert vom Ansaugen der Probe bis zum Schreiberausschlag 350 s. Davon beträgt die reine Reaktionszeit 210 s. Als Reaktionstemperatur hat sich Raumtemperatur (23,5°C) bewährt

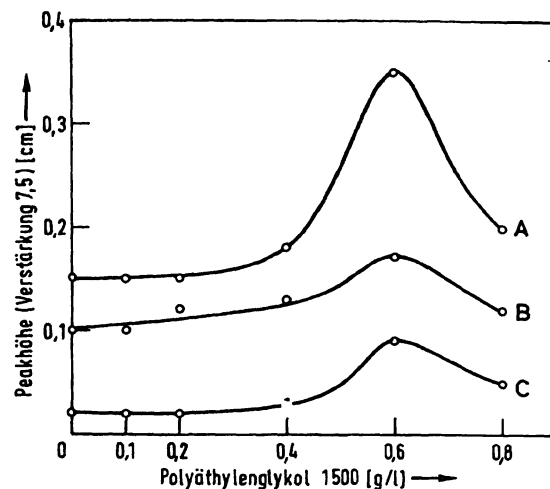


Abb. 7. Abhängigkeit der Peakhöhe bei der Tetanus-Antikörper-Bestimmung von der Konzentration an Polyäthylenglykol 1500 bei drei verschiedenen Antikörper-Konzentrationen: A = 5,0; B = 2,5; C = 1,25 I. E./l. Tetanus-Toxoid = 1000 L_f/l. Ansätze in Michaelis-Puffer-HCl-Lösung (pH 5,13; Gesamtsalz-Konzentration 6,5 mmol/l) der jeweiligen Polyäthylenglykol 1500-Konzentration (0; 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 g/l Polyäthylenglykol). Abzisse: Polyäthylenglykol 1500-Konzentration im Reaktionsgemisch in g/l. Ordinate: Peakhöhe in cm (Verst. 7,5).

(8). Je nach Vorverdünnungsgrad der Antikörper-Proben ist die Methode in der Lage, 40 bis 80 vorverdünnte Einzelproben pro Stunde zu bewältigen. Dabei wird im zeitlichen Verhältnis von 1:1 Probe angesaugt und zwischengespielt.

Die Empfindlichkeit der Methode ist hoch. Sie unterscheidet noch Antikörper-Konzentrationen kleiner als 0,5 I. E./l bei einer unteren Nachweisbarkeitsgrenze von maximal 0,5 I. E./l (s. Abb. 2). Beim Bestimmen von Antikörper-Konzentrationen unbekannter Seren müssen die Proben wegen der hohen Eigenstreuung mindestens 1:20 vorverdünnt werden bei Ausnutzung der maximal möglichen Geräteverstärkung bei Seren niedriger Antikörper-Konzentration. Bezogen auf unverdünnte Serumproben ermöglicht diese Methode, Schwellenwert-Antikörper-Konzentrationen von 10 I. E./l noch zu messen. Stark lipämische Seren sind für diese Methode wegen ihrer hohen Eigenstreuung weniger gut zu verwenden. Durch Zentrifugieren bei 11000 g und Filtration der Seren durch Membranfilter mit Porenstärken kleiner als 0,1 µm läßt sich eine Eigenstreuung jedoch merklich verringern.

Die Präzision dieser Methode in der Serie und von Tag zu Tag ist an einer niedrigen Antikörperkonzentration von 5,0 I. E./l unter folgenden Bedingungen ermittelt worden: Tetanus-Toxoid-Lsg. 16025 L_f/l; Antigen und Antikörper in Michaelis-Puffer-HCl-Lösung, pH 5,13, Gesamtpuffersalz-Konzentration 10 mmol/l, angesetzt:

1. Präzision in der Serie:

a) Eigenstreuungspeaks

n = 20; $\bar{x} \pm s = 0,348 \text{ cm} \pm 0,0148 \text{ cm}$; VK % = 4,262.

- b) Antigen-Antikörper-Peaks plus Eigenstreuung
 $n = 20$; $\bar{x} \pm s = 0,776 \text{ cm} \pm 0,038 \text{ cm}$; VK % = 4,989.
 Fortgeleiteter relativer Fehler aus a) und b) : 6,562%.
2. Präzision von Tag zu Tag:
- a) Eigenstreuungspeaks
 $n = 20$ Tage; $\bar{x} \pm s = 0,342 \text{ cm} \pm 0,0192 \text{ cm}$; VK % = 5,624.

Tab. 1. Antikörper-Konzentrations-Vergleiche von neun verschiedenen Seren mit der „L₊-Methode an der Maus“ (Behringwerke AG) (= A) und der automatischen Immunpräzipitations-Methode (= B) in I. E./l:

Serum-Nr.	A	B
23	> 500 < 1000	678
37	> 100 < 500	307,5
68	≤ 100	126,2
75	ca. 500	735,0
87	> 50 < 100	88,5
100	ca. 500	549
121	> 100 < 500	473
146	> 500 < 1000	706,5
158	> 100 < 500	331

- b) Antigen-Antikörper-Peaks plus Eigenstreuung
 $n = 20$ Tage; $\bar{x} \pm s = 0,786 \text{ cm} \pm 0,0708 \text{ cm}$;
 VK % = 8,997.
 Fortgeleiteter relativer Fehler aus a) und b) : 10,61%.

Den Vergleich von Antikörper-Konzentrationen in neun verschiedenen Seren, mit der „L₊-Methode an der Maus“ und der hier beschriebenen Methode, ermittelt, zeigt Tabelle 1. Es ergibt sich eine recht gute Übereinstimmung der an der Maus bestimmten Antitoxin-Konzentrationen mit den über die automatische Immunpräzipitationsmethode ermittelten menschlichen Antikörper-Konzentrationen. Eine gute Übereinstimmung finden *Habermann* et al (5) ebenfalls mit ihrer radioimmunologischen Antikörper-Bestimmungsmethode zur „L₊-Methode an der Maus“. Genau wie *Habermann* et al aus ihren Untersuchungsergebnissen schließen, läßt die hier beschriebene Methode ebenfalls nicht den Schluß zu, daß diese Methode andere nicht-antitoxische Antikörper nachweist. *Cohen* und *Nagel* (10, 11) beweisen gleichfalls in ihren Untersuchungen, daß alle gefundenen menschlichen Antikörper antitoxisch reagieren.

Literatur

- Harrfeld, H. P. (1969), Deut. Med. Wochenschr. 94, 1101–1106.
- Mai, K. & Rosin, H. (1969), Z. Immunitätsforsch. Exp. Ther. 138, 178–190.
- Mai, K., Bartelheimer, H. K. & Rosin, H. (1970), Deut. Med. Wochenschr. 95, 1044–1050.
- Schmidt, H. (1931), Die Praxis der Auswertung von Toxinen und Antitoxinen, S. 32–51, G. Fischer-Verlag, Jena.
- Habermann, E. & Wiegand, H. (1973), Naunyn-Schmiedeberg Arch. Pharmacol. 276, 321–326.
- Müller, W. M. (1968), Die gelben Hefte Nr. 15, S. 697–701, Immunbiolog. Informationen der Behringwerke AG.
- Harrfeld, H. P. (1972), Deut. Med. Wochenschr. 97, 364–368.
- Ebeling, H. (1973), diese Z. 11, 209–214.
- Helsing, K. (1972), A. I. P., Automated Immuno Precipitin reactions, S. 17–20, Colloquium on A. I. P., Brussels 1972, Technicon International Congress, New York, 1972.
- Cohen, H., Nagel, J., van der Veer, M. & Peetroom, F. (1970), J. Immunol. 104, 1417–1423.
- Nagel, J. & Cohen, H. (1973), J. Immunol. 110, 1388–1395.

Dr. H. Ebeling
 Institut für Klinische Chemie und Klinische Biochemie
 am Klinikum Steglitz der Freien Universität Berlin
 1 Berlin 45
 Hindenburgdamm 30